

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Hematologia

2013

Mari Kuusisto

# LEUKOSYYTTIEN ERITTELYLASKENNAN TULOSTEN VERTAILU



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Mari Kuusisto

# LEUKOSYYTTIEN ERITTELYLASKENNAN TULOSTEN VERTAILU

Leukosyyttien erittelylaskenta on perinteinen hematologinen tutkimusmenetelmä, jonka avulla voidaan tutkia leukosyyttien solumorfologiaa. Erittelylaskenta on nykyään automatisoitua, mutta manuaalinen erittelylaskenta tulee silti kyseeseen tietyissä tapauksissa. Manuaalinen erittelylaskenta suoritetaan veritautien tutkimisessa ja diagnosoinnissa sekä leukosytoosin tai leukopenian selvityksessä. Laskennassa solut tunnistetaan niiden morfologisten ominaisuuksien mukaisesti.

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kahden eri laskentamenetelmän vaikutusta leukosyyttien prosenttiosuuksiin leukosyyttien erittelylaskennassa. Tutkimuksessa vertailtiin laskentaa, joka suoritettiin pystysuorassa sivelyvalmisteen alareunasta yläreunaan valmisteen optimaalisella alueella laskentaan, joka suoritettiin vaakasuorassa valmisteen häntäpäästä kohti paksua päätä pysytellen valmisteen optimaalisella alueella. Tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa empiiristä näyttöä laskentamenetelmien eroavaisuuksista.

Tutkimuksessa kerättiin opiskelijoista 30 verinäytettä, joista valmistettiin sivelyvalmisteita  $n=90$ , jolloin yhdestä verinäytteestä saatiin kolme sivelyvalmistetta. Sivelyvalmisteet valmistettiin kolmen tunnin sisällä näytteenotosta. Sivelyvalmisteet kiinnitettiin saman päivän aikana metanolissa ja värjättiin May-Grünwald-Giemsa -värjäyksellä. Leukosyyttien erittelylaskenta suoritettiin molemmilla laskentatavoilla mikroskoopissa laskien 200 solua. Tutkimuksen empiirinen osuus suoritettiin Turun ammattikorkeakoulun tiloissa.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että laskentamenetelmien välillä ei ole merkitsevää eroavaisuutta leukosyyttien erittelylaskennan tuloksissa. Tutkimuksen tuloksista kuitenkin huomattiin lymfosyyttien määrän olevan suurempi laskennassa, joka suoritettiin vaakasuorassa valmisteen häntäpäästä kohti paksua päätä. Neutrofiilien määrä puolestaan oli suurempi laskennassa, joka suoritettiin pystysuorassa valmisteen alareunasta yläreunaan. Ero näiden laskentatapojen välillä ei kuitenkaan ollut merkitsevää.

## ASIASANAT:

Leukosyytti, perifeerisen veren sivelyvalmiste, May-Grünwald-Giemsa -värjäys, leukosyyttien erittelylaskenta

Mari Kuusisto

## COMPARISON OF THE RESULTS OF LEUKOCYTE DIFFERENTIAL COUNT

Leukocyte differential count is traditional haematological technique which can be used to examine morphology of leukocytes. Nowadays the differential count is automated but the manual differential count is still to be considered in certain cases. Manual differential count is performed when investigation and diagnosing blood diseases and sorting out of leukocytosis or leukopenia. In differential count, the leukocytes are identified by characteristics of the morphology.

The purpose of the research was to compare the effect in percentage of leukocytes in differential count by using two different counting methods. The research compared the counting method in which the counting was performed vertical from the base to the top of the peripheral blood smear in the optimal area to a counting method, where the counting was performed horizontal from the tail to the thick part staying still in the optimal area. The aim of the research was to produce empirical evidence of differences in these counting methods.

In the research, 30 blood samples were collected of students. Peripheral blood smears were made of blood samples and the total amount was  $n=90$ , when three blood smears were made by one blood sample. The peripheral blood smears were made in three hours of the phlebotomy. The blood smears were fixed in methanol on the same day and were stained by a May-Grünwald-Giemsa –stain. The leukocyte differential count was performed by counting 200 cells in microscope with two different counting methods. The empirical part of the research was performed in Turku University of Applied Sciences.

The research shows that there are no significant differences in leukocyte differential count between these two counting methods. The results of the research was seen that the amount of lymphocytes was higher in counting method that was performed horizontal from the tail to the thick part of blood smear. The amount of neutrophils, in turn, was higher in counting method that was performed vertical from the base to the top of blood smear. The difference between these counting methods was not significant.

### KEYWORDS:

Leukocyte, peripheral blood smear, May-Grünwald-Giemsa –stain, leukocyte differential count

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 LEUKOSYYTTIEN ERITTELYLASKENTA</b>	<b>7</b>
2.1 Leukosyytit	7
2.1.1 Granulosyytti	7
2.1.2 Lymfosyytti	8
2.1.3 Monosyytti	9
2.2 Perifeerisen veren sivelyvalmiste	9
2.2.1 Sivelyvalmisteen teko	10
2.3 May-Grünwald-Giemsa –värjäys	11
2.3.1 Värjäyksen suoritus	12
2.3.2 Värjäytyvyyteen vaikuttavat tekijät	13
2.4 Leukosyyttien erittelylaskennan suorittaminen	14
2.4.1 Sivelyvalmisteen makroskooppinen tarkastelu	14
2.4.2 Sivelyvalmisteen mikroskooppinen tarkastelu	14
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET</b>	<b>17</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS</b>	<b>18</b>
4.1 Metodologiset lähtökohdat	18
4.2 Eettiset lähtökohdat	18
4.3 Toteutus	19
<b>5 TULOKSET</b>	<b>23</b>
5.1 Neutrofiilien tulokset	23
5.2 Lymfosyyttien tulokset	24
5.3 Monosyyttien tulokset	25
5.4 Eosinofiilien tulokset	27
<b>6 POHDINTA</b>	<b>30</b>
6.1 Johtopäätökset	30
6.2 Luotettavuuden arviointi	32
<b>LÄHTEET</b>	<b>35</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Köhlerin valaistuksen säätö
- Liite 2. Suostumuslomake
- Liite 3. MGG-värjäysliuoksen valmistus
- Liite 4. Parierojen t-testit

## KUVAT

Kuva 1. Perifeerisen veren sivelyvalmiste (Kuusisto, 2013).	11
Kuva 2. Laskentamenetelmät (Kuusisto, 2013).	16
Kuva 3. Laskentamenetelmät (Kuusisto, 2013)	21

## KUVIOT

Kuvio 1. Neutrofiilien sirontakuvio ja regressiosuora	24
Kuvio 2. Lymfosyyttien sirontakuvio ja regressiosuora	25
Kuvio 3. Monosyyttien sirontakuvio ja regressiosuora	27
Kuvio 4. Eosinofiilien sirontakuvio ja regressiosuora	29

## TAULUKOT

Taulukko 1. Neutrofiilien tunnusluvut ja p-arvo	23
Taulukko 2. Lymfosyyttien tunnusluvut ja p-arvo	24
Taulukko 3. Monosyyttien tunnusluvut ja p-arvo	26
Taulukko 4. Eosinofiilien tunnusluvut	27
Taulukko 5. Wilcoxonin testi eosinofiileille	28
Taulukko 6. Spearmanin korrelaatiokerroin eosinofiileille	29

# 1 JOHDANTO

Manuaalinen leukosyyttien erittelylaskenta on yksi perinteisistä hematologisista tutkimuksista, joka on sekä työläs että taitoa vaativa tutkimus (Siitoinen & Jansson, 2007). Leukosyyttien lukumäärää laskettaessa valmistetaan perifeerisen veren sivelyvalmiste EDTA –verestä, joka värjätään spesifisellä värjäysmenetelmällä (Bain, 2002, Carr & Rodak, 2009). Laskenta suoritetaan mikroskoopilla, jolla lasketaan leukosyyttien prosenttiosuudet eri soluryhmien mukaan (Lewis, Bain & Bates, 2006, Savolainen, 2007).

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia, millainen ero on kahden laskentatavan välillä leukosyyttien erittelylaskennan prosenttiosuuksissa. Tutkimus perustuu alan kirjallisuudessa esiintyviin eroihin leukosyyttien laskentatavassa. Turun ammattikorkeakoulun käyttämä laskentatapa perustuu Clinical Haematology Atlas –oppikirjan (Carr & Rodak, 2009) esittämään tapaan suorittaa erittelylaskenta, jossa leukosyytit lasketaan pystysuorassa edeten alhaalta ylöspäin valmisteen optimaalisella alueella, jolloin virheen mahdollisuus pienenee leukosyyttien jakaumassa. Toisessa laskentatavassa leukosyytit lasketaan vaakasuorassa edeten valmisteen häntäpäästä paksua päätä kohden valmisteen optimaalisella alueella, jolloin laskennasta tulee tarkempi. Molemmat laskentatavat perustuvat leukosyyttien epätasaiseen jakautumiseen sivelyvalmisteelle solujen ominaisuuksien mukaisesti. Tällöin lymfosyytit painottuvat sivelyn paksuun päähän ja neutrofiilit sekä monosyytit painottuvat sivelyn ohueen päähän. (Mahlamäki, 2004, Carr & Rodak, 2009.)

Opinnäytetyön avulla pystytään toteamaan mahdollisia tuloseroja erittelylaskennassa, sillä laskennan suorittajat kehittävät itselleen oman työtapansa, jolla solumorfologia saadaan arvioitua (Siitoinen & Jansson, 2007). Samalla saadaan tuotettua empiiristä näyttöä laskentatavoista, joita alan kirjallisuudessa esiintyy.

## 2 LEUKOSYYTTIEN ERITTELYLASKENTA

### 2.1 Leukosyytit

Leukosyytit eli veren valkosolut ovat osa ihmisen immuunijärjestelmää (Henley, Knight & Blann, 2010). Ne jaotellaan yleensä fagosytoiviin soluihin ja immunosyytteihin. Fagosytoiviin soluihin kuuluvat granulosyytit sekä monosyytit ja immunosyytteihin kuuluvat lymfosyytit. Fagosytoivista soluista granulosyytit jaetaan kolmeen alaryhmään: neutrofiileihin, eosinofiileihin ja basofiileihin. (Hoffbrand & Moss, 2011.) Leukosyytit muodostuvat luuytimessä, jossa ne saavat alkunsa yhteisestä monikykyisestä hematopoieettisesta kantasolusta. Granulosyytit saavat alkunsa myelooisista kantasolusta ja lymfosyytit puolestaan lymfaattisesta kantasolusta. (Siitonen & Koistinen, 2007, Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkqvist, 2009.)

#### 2.1.1 Granulosyytti

*Neutrofiilit* ovat fagosytoivia soluja, jotka tappavat erityisesti bakteereja ja mikrobeja. Ne ovat läpimitaltaan noin 13 µm mittaisia ja niiden ominaispiirre on vaa-leanpunertavat granulat ja liuskoittunut tuma. (Vilpo, 2010). Neutrofiilit esiintyvät veressä yleensä vain vuorokauden, jonka jälkeen ne siirtyvät kudoksiin, jossa ne kuolevat apoptoottisesti muutamassa vuorokaudessa makrofagien toimesta (Siitonen & Koistinen, 2007). Neutrofiilejä esiintyy veressä 40–80 % kaikista valkosoluista (Savolainen, 2007).

*Eosinofiilit* ovat samankaltaisia kuin neutrofiilit, mutta niiden sytoplasman granulaarisuus on karkeampi ja punertavampi (Hoffbrand & Moss, 2011). Myös tuma on lohkoutunut, mutta yleensä kahteen lohkoon ja ne ovat hieman suurempia kuin neutrofiilit, noin 12-17 µm. Eosinofiilien tärkein tehtävä veressä on parasiittien torjunta ja allergisten reaktioiden säätely sekä puolustusreaktio tulehdus-sissa. Eosinofiilit esiintyvät veressä vain muutamia tunteja, mutta kudoksissa ne

esiintyvät neutrofiiliä pidempään. (Siitonen & Koistinen, 2007, Vilpo, 2010.) Eosinofiilejä on noin 1-6 % veren valkosoluista (Savolainen, 2007).

*Basofiilit* ovat harvinaisempia leukosyyttejä verenkierrossa. Niillä on tummia granuloita sytoplasmassaan, jotka usein täyttävät koko solun. Granulat sisältävät hepariinia ja histamiinia. (Hoffbrand & Moss, 2011.) Ne toimivatkin eosinofiilien tapaisesti elimistön allergisissa reaktioissa sekä puolustusreaktioissa tulehduksia vastaan. Basofiilit esiintyvät veressä muutaman tunnin ja kudoksissa ne muuttuvat syöttösoluiksi. (Siitonen & Koistinen, 2007.) Basofiilejä esiintyy veressä alle 1-2 % kaikista valkosoluista (Savolainen, 2007).

### 2.1.2 Lymfosyytti

*Lymfosyytit* avustavat granulosyyttejä elimistön puolustusreaktioissa ja ne aktivoivat immuunipuolustuksen. Lymfosyytit jaetaan B- ja T-lymfosyytteihin sekä NK-soluihin eli tappajasoluihin, mutta ryhmiä ei kuitenkaan pystytä luotettavasti erottamaan toisistaan mikroskoopissa. (Siitonen & Koistinen, 2007, Vilpo, 2010.) B-lymfosyytit kehittyvät luuytimessä ja kiertävät verenkierrossa antigeenin tunnistamiseen asti. Tämän jälkeen B-lymfosyytit kehittyvät joko muistisoluiksi tai plasmasoluiksi. (Hoffbrand & Moss, 2011.) T-lymfosyytit kehittyvät kateenkorvassa ja tunnistavat myös vieraita antigeenejä sekä aloittavat B-lymfosyyttien vasta-ainetuotannon ja auttavat niiden proliferoitumisessa. NK-solut syntyvät joko luuytimessä omasta solulinjastaan tai T-solulinjan progenitorisoluta. (Siitonen & Koistinen, 2007.) Elimistön lymfosyyteistä noin 80 % ovat T-soluja ja noin 20 % B-soluja (Hoffbrand & Moss, 2011).

Lymfosyytit ovat pieniä ja niiden sytoplasma on sinisävyinen ja tuma pyöreä sekä tiivis (Vilpo, 2010). Lymfosyyttejä esiintyy veren valkosoluista 20–40 %, mutta lapsilla luku on suurempi (Savolainen, 2007).



### 2.1.3 Monosyytti

*Monosyytit* ovat fagosytoivia soluja, jotka ovat yleensä suurempia kuin muut leukosyytit, 15–18 µm (Nienstedt ym., 2009, Hoffbrand & Moss, 2011). Sen tumma on yleensä suuri ja niissä on siniharmaa sytoplasma, joka saattaa sisältää pieniä punertavia granuloita (Vilpo, 2010, Hoffbrand & Moss, 2011). Monosyytit ovat elimistön tärkeimpiä fagosytoivia soluja ja niillä on tärkeämpi rooli immunologisessa puolustuksessa, sillä ne esittelevät vieraan antigeenin lymfosyyteille (Vilpo, 2010). Monosyytit esiintyvät verenkierrossa noin kolme päivää, jonka jälkeen ne siirtyvät kudoksiin ja erilaistuvat makrofageiksi (Siitonen & Koistinen, 2007). Monosyyttejä on veren valkosoluista noin 2-10 % (Savolainen, 2007).

### 2.2 Perifeerisen veren sivelyvalmiste

Perifeerisen veren sivelyvalmisteen avulla pystytään tarkastelemaan solumorfologiaa mikroskoopissa ja sen avulla suoritetaan leukosyyttien erittelylaskenta (Siitonen & Jansson, 2007, Carr & Rodak, 2009). Sivelyvalmiste tehdään mahdollisimman tuoreesta EDTA eli etyleenidiamiinitetra-asetaatia antikoagulanttina sisältävästä laskimoverestä. EDTA –antikoagulantti on lisättyä verinäyteputken sisäreunoilla, jonka vuoksi EDTA:n liukeneminen vereen on nopeampaa. (Lewis & Tatsumi, 2006.) Näytteenotossa EDTA-verinäyte tulee saada putkeen esteettömästi, sillä epäonnistunut pistos tai veren kova paine putkeen voivat aiheuttaa näytteen hemolysoitumisen. Näytteenoton jälkeen putkea sekoitetaan hyvin, jotta antikoagulantti ja veri sekoittuvat toisiinsa. (Savolainen, 2007.)

EDTA sisältää natrium ja kalium-suoloja, jotka ovat tehokkaita antikoagulantteja hematologian tutkimuksiin. EDTA toimii veressä kelatoimalla kalsiummolekyylejä, joka estää näytteen hyytymistä. Hematologian tutkimuksia varten käytetään yleensä K<sub>2</sub>-EDTA:a, sillä sen on osoitettu pitävän veren solut parhaimmassa muodossa. Esimerkiksi K<sub>3</sub>-EDTA voi aiheuttaa punasolujen kutistumista. (Lewis & Tatsumi, 2006.) Näytteenotossa tulee kiinnittää huomiota putken oikeaan täyttötilavuuteen (+/-20 %), sillä vajaa putki aiheuttaa EDTA-

antikoagulantin ylimäärän, joka aiheuttaa sekä punasolujen että leukosyyttien kutistumista ja hajoamista. Tämän vuoksi on hyvin tärkeää, että näytettä ottaessa verta tulee putkeen oikea määrä suhteessa antikoagulantin määrään. (Lewis & Tatsumi, 2006, Savolainen, 2007.) EDTA-pitoisuus tulisi olla 1,5 mg/ml, jotta solujen säilyvyys olisi parhain mahdollinen (Mahlamäki, 2004).

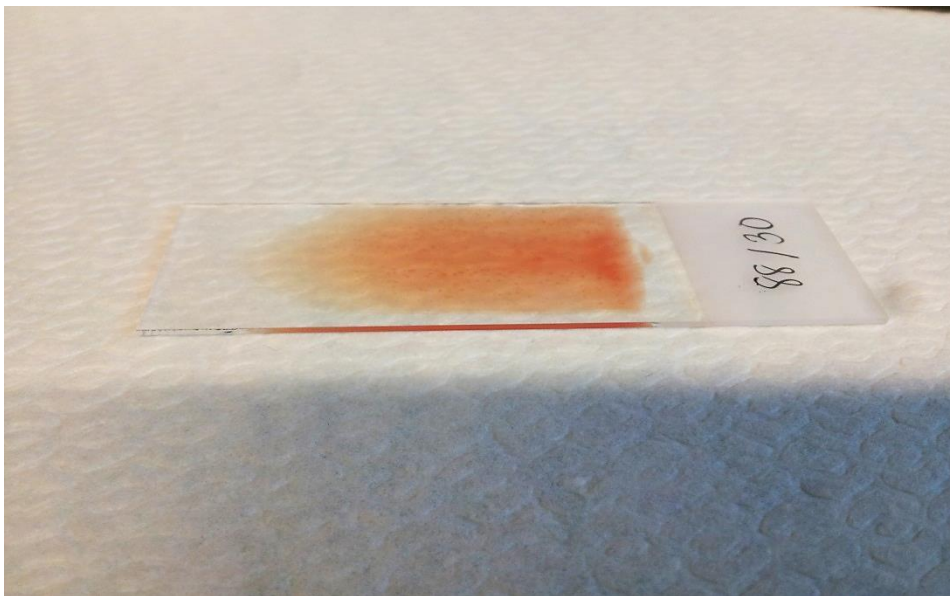
EDTA-veri säilyy yleensä huoneenlämmössä muutamia tunteja ja jääkaappilämpötilassa vuorokauden, mutta perifeerisen veren sivelyvalmisteen laadukkaaseen valmistukseen tarvitaan mahdollisimman tuoretta EDTA-verta. Sivelyvalmiste tuleeikin tehdä mahdollisimman pian näytteen keräämisestä, mutta kuitenkin kolmen tunnin sisällä. Yli kolmen tunnin säilytyksessä on havaittu näkyviä muutoksia solujen morfologiassa ja yli 12 tunnin säilytyksessä muutokset ovat silmiinpistäviä. Tämä vaikuttaa erityisesti neutrofiileihin, sillä ne värjäytyvät homogeenisemmin kuin tuoreessa veressä. Solut alkavat myös vakuolisoitua etenkin monosyyteissä. (Lewis & Tatsumi, 2006.)

### 2.2.1 Sivelyvalmisteen teko

Sivelyvalmisteen teko aloitetaan sekoittamalla EDTA –verinäyte hyvin joko käsin tai sekoittajalla. Riittävän sekoituksen jälkeen laadukkaan objektilasin hiospään viereen laitetaan putkesta annostelijan avulla pieni veripisara. Liian isosta veripisarasta syntyy liian paksuja valmisteita, liian pieni pisara puolestaan aiheuttaa liian lyhyen vedon, jolloin valmisteen optimaalinen laskentakohta on liian pieni. Vetolasin avulla pisara levitetään 30–45 asteen kulmassa, jonka jälkeen nopealla liikkeellä työnnetään levinnyttä pisaraa kohti aluslasin toista päätä. Mikäli veto on liian hidas, monosyytit ja granulosyytit painottuvat valmisteen loppupäähän ja sivuille ja leukosyytit ovat valmisteella harvassa. (Siitonen & Jansson, 2007, Carr & Rodak, 2009.) Laadukas valmiste edellyttää oikeaa veto-tekniikkaa, jonka vuoksi sivelyvalmisteiden tekemiseen tarvitaan harjoitusta (Mahlamäki, 2004).

Sivelyn tulee olla noin 3 cm pitkä ja pyöreäpäinen eikä siinä saa olla reikiä tai viiruja. Valmisteen reikäisyys ja viirut syntyvät likaisesta aluslasista tai huonosta

vetolasista, jolloin erittelylaskentaa suoritettaessa saadaan epäluotettava tulos. (Bain & Lewis, 2006, Siitoinen & Jansson, 2007.) Laadukkaan sivelyvalmisteen aikaansaamiseksi vetolasin ja objektilasin tulee olla puhtaat rasvasta sekä pölystä ja vetolasin reunan tulee olla myös ehytreunainen ja laadukas (Bain, 2002, Mahlamäki, 2004). Onnistuneessa sivelyssä tulee myös näkyä prisman värit käännettäessä lasia valoa vasten (Carr & Rodak, 2009). Valmis sivelyvalmiste ilmakeivataan tai vaihtoehtoisesti voidaan käyttää puhallinta valmisteen kuivaamiseen (Bain & Lewis, 2006). Tämän jälkeen valmiste kiinnitetään metanolissa ja värjätään May-Grünwald-Giemsa –värjäyksellä (Bain & Lewis, 2006).



Kuva 1. Perifeerisen veren sivelyvalmiste (Kuusisto, 2013).

### 2.3 May-Grünwald-Giemsa –värjäys

May-Grünwald-Giemsa –värjäys eli MGG –värjäys on perinteinen hematologinen värjäysmenetelmä, jota käytetään perifeerisen veren sekä luuytimen sivelyvalmisteiden värjäykseen (Siitoinen & Jansson, 2007; 109). Värjäys koostuu May-Grünwaldin reagenssista, jossa hapan eosiini ja emäksinen metyleeninsi-

ninen toimivat värjäävinä aineina sekä Giemsa–reagenssista, jossa värjäävänä aineena toimii atsuuriväri. Värjäyksen avulla leukosyytit sekä muut verisolut värjäytyvät niiden sytokemiallisten ominaisuuksien mukaisesti. Värjäysten reaktiot ovat myös riippuvaisia pH:sta, jonka tulisi olla 6,8. Oikea pH saadaan fosfaattipuskuriliuoksella, joka lisätään värjäysreagensseihin tislatusella vedellä laimennettuna. (Reagena Oy 2003, Bain & Lewis, 2006, Carr & Rodak, 2009.)

### 2.3.1 Värjäyksen suoritus

MGG –värjäys aloitetaan kiinnittämällä hyvin ilmakeivattu sivelyvalmiste metanolissa 10 minuuttia (Reagena Oy 2003, Bain & Lewis, 2006). Liian lyhyt kiinnitysaika saattaa johtaa esimerkiksi sinivoittoiseen värjäystulokseen. Kiinnityksineen käytettävän metanolin tulee olla vedetöntä, jotta vesipeiliartefaktilta vältyttäisiin. (Siitoinen & Jansson, 2007.) Kiinnittäminen tulee tapahtua mahdollisimman pian sivelyvalmisteen tekemisestä (Bain & Lewis, 2006).

Kiinnityksen jälkeen valmisteet siirretään May-Grünwaldin värjäysliuokseen, joka koostuu May-Grünwaldin reagenssista sekä puskuroidusta vedestä. Valmistetta pidetään liuoksessa 5 minuutin ajan. (Reagena Oy 2003.) May-Grünwaldin liuoksessa hapan eosini värjää punasolut punertaviksi ja emäksinen metyleeninsininen värjää leukosyyttien tumat sinisiksi (Siitoinen & Jansson, 2007).

May-Grünwaldin värjäysliuoksen jälkeen valmisteet siirretään Giemsan liuokseen 12 minuutin ajaksi. Giemsan värjäysliuos valmistetaan puskuroidusta vedestä ja Giemsan reagenssista. (Reagena Oy 2003.) Giemsan värjäysliuosta tehdessä puskuroitu vesi tulee lisätä astiaan ensin, jonka jälkeen lisätään varovasti Giemsan reagenssi. Tällä estetään väripigmenttien sakkautuminen, sillä Giemsa –reagenssin sisältämä metanoli saattaa haihtua ennen puskuriliuoksen lisäämistä. Myös värjäysliuoksen sekoittaminen tulee tehdä varovasti väripigmenttien sakkautumisen välttämiseksi. Giemsa –värjäysliuoksen sisältämä atsuuriväri värjää yhdessä eosinin kanssa leukosyyttien granulat. Se värjää myös

metyleeninsinen ja eosiinin kanssa tumat punasinisiksi. (Siitoinen & Jansson, 2007.)

Värjäysliuoksien jälkeen valmisteet huuhdellaan puskuroidussa vedessä 2 minuutin, 5 minuutin ja 2 minuutin sarjoissa kolmessa eri astiassa. Tämän jälkeen valmisteet ilmakeivataan pystyasennossa huoneenlämmössä tai lämpökaapissa. (Reagena Oy 2003.) Kuivauksen jälkeen valmisteet voidaan päällystää arkistointia varten, mikäli se on tarpeen. Päällystys suojaa valmistetta naarmuuntumiselta ja lialta. (Bain, 2002.)

### 2.3.2 Värjäytyvyyteen vaikuttavat tekijät

May-Grünwald-Giemsa –värjäysprosessiin liittyy tekijöitä, jotka vaikuttavat oleellisesti valmisteen värjäytyvyyteen. Värjäytyvyyteen ja tarkasteluun vaikuttavia tekijöitä ovat värin sakkautuminen, värjäystulosten vaihtelu, värisävyjen sini- ja punavoittoisuus, ylivärjäytyminen, tumakromatiinin homogeeninen rakenne ja vesipeiliartefakti. (Siitoinen & Jansson, 2007.)

Väärät laimennokset ja liuosten väriaineiden sakkautuminen vaikuttavat värjäytyvyyteen aiheuttamalla värin sakkautumista ja värjäystuloksen vaihtelua. Sinivoittoiset värisävyt aiheutuvat väärästä pH:sta, liian pitkästä värjäysajasta, lyhyestä huuhtelusta ja kiinnityksestä sekä huonolaatuisesta kiinnitysmetanolista. Punavoittoiset värisävyt puolestaan aiheutuvat myös väärästä pH:sta, pitkästä huuhtelusta, huonosta kuivauksesta ja lyhyestä värjäysajasta. Ylivärjäytyminen aiheutuu niin ikään pitkästä värjäysajasta. Kiinnitysmetanolin huonolaatuisuus tai liian lyhyt kiinnitysaika vaikuttavat tumakromatiinin homogeeniseen rakenteeseen. Vesipeiliartefakti syntyy, kun kiinnitysmetanolissa on vettä. (Siitoinen & Jansson, 2007.)

## 2.4 Leukosyyttien erittelylaskennan suorittaminen

Leukosyyttien erittelylaskenta suoritetaan nykyään automaattilaitteilla, mutta manuaalinen laskentamenetelmä on myös tarpeellinen. Automaattilaitteet eivät välttämättä tunnista morfologialtaan epänormaaleja soluja, jolloin manuaalinen erittelylaskenta tulee kyseeseen. Manuaalinen laskentatapa on välttämätön veritautien diagnoosin asettamisessa tai poissulkemisessa sekä hoitovasteen seurannassa. Mikroskooppinen tarkastelu suoritetaan myös leukopenian ja leukosytoosin selvittelyssä. (Mahlamäki, 2006, Siitoinen & Jansson, 2007.)

### 2.4.1 Sivelyvalmisteen makroskooppinen tarkastelu

Sivelyvalmisteen tarkastelu tehdään systemaattisesti aloittaen makroskooppisesta tarkastelusta. Sen avulla tarkastellaan sivelyn laadukkuutta, kuten sivelyn pituutta ja paksuutta sekä värjäytyvyyttä (ks. s. 11). Värjäytyvydessä kiinnitetään huomiota tasaisuuteen ja poikkeavien väriksöjen esiintymiseen. Poikkeavat väriksat voivat olla merkki esimerkiksi trombosyyttiaggregaateista. (Bain, 2006.)

### 2.4.2 Sivelyvalmisteen mikroskooppinen tarkastelu

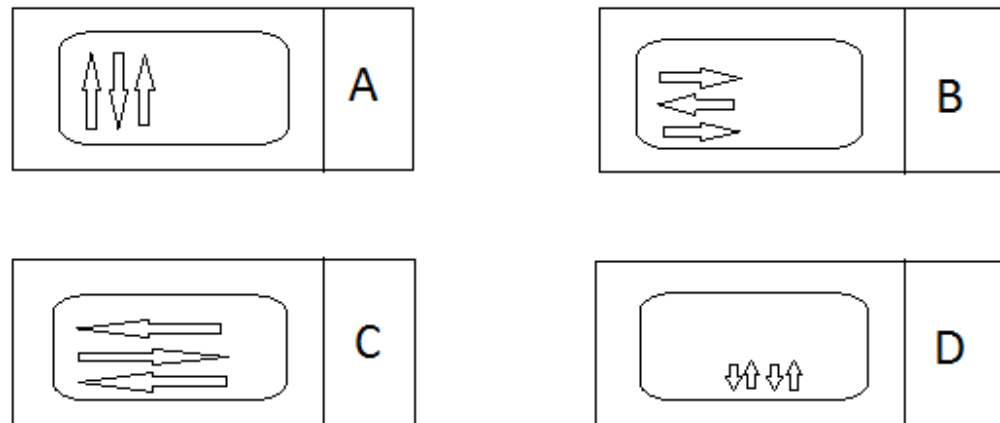
Leukosyyttien erittelylaskentaa varten tulee käyttää laadukasta mikroskooppia, joka tulee huoltaa ja puhdistaa säännöllisesti. Ennen mikroskooppista tarkastelua tulee mikroskooppiin suorittaa Köhlerin valaistuksen säätö (Liite 1.), jolla pyritään tuottamaan mahdollisimman hyvä kuva ja näin ollen mikroskoopin paras mahdollinen suorituskky saadaan käyttöön. (Abramowitz, 2003.)

Sivelyvalmisteen laatu arvioidaan mikroskooppisesti käyttämällä 10x - suurentavaa objektiivia. Valmisteelta tarkastellaan leukosyyttien värjäytymistä, määrää, mahdollisia poikkeamia ja valmisteen laadukkuutta. Ennen laskennan aloittamista valmisteelta etsitään myös optimaalinen alue, jossa punasolut eivät ole liian kiinni toisissaan tai liian harvakseltaan. Liian paksu tai ohut kohta valmis-

teella aiheuttaa artefaktoja leukosyyttien morfologiassa valmisteeseen hitaan tai liian nopean kuivumisen vuoksi. Optimaaliselta alueelta leukosyyttien tunnistaminen ja rakenteiden erottaminen on helpointa ja erittely luotettavaa. (Bain, 2006, Siitoinen & Jansson, 2007.)

Leukosyyttien erittelylaskenta suoritetaan käyttämällä 50x -suurentavaa öljyimersio-objektiivia, jonka avulla lasketaan yleensä 200 peräkkäistä leukosyyttiä valmisteeseen optimaaliselta alueelta jaotellen solut omiin ryhmiinsä. Solujen tunnistaminen perustuu solun ja tuman kokoon ja niiden rakenteeseen, sytoplasman värjäytyvyyteen, määrään sekä granulaarisuuteen. Mitä enemmän soluja lasketaan, sitä pienempi on tulosten variaatio. (Mahlamäki, 2004.)

Leukosyyttien erittelylaskenta suoritetaan laskemalla leukosyytit pystysuorassa edeten alhaalta ylöspäin valmisteeseen optimaalisella alueella (Menetelmä A, ks. Kuva 2). Edellä mainittu tapa vähentää virheen mahdollisuutta leukosyyttien jakaumassa, sillä leukosyytit jakautuvat sivelyvalmisteele epätasaisesti solujen ominaisuuksien mukaan niin, että monosyytit ja neutrofiilit keskittyvät valmisteeseen häntäpäähän ja valmisteeseen paksussa päässä lymfosyytit ovat puolestaan yliedustettuina (Mahlamäki, 2004, Carr & Rodak, 2009). Laskenta voidaan suorittaa myös muilla laskentamenetelmillä alla olevan kuvan osoittamien menetelmien mukaisesti. Laskenta voidaan suorittaa myös vaakasuoraan (menetelmä B) valmisteeseen optimaalisella alueella (Mahlamäki, 2004). Leukosyytit voidaan laskea myös koko sivelyn pituudelta (menetelmä C), jolloin jakauma on mahdollisimman luotettava, mutta leukosyyttien tunnistaminen on hankalampaa etenkin sivelyn paksussa päässä, mikä aiheuttaa virhelähteitä laskennassa (Bain, Lewis & Bates, 2006). Erittelylaskenta voidaan suorittaa myös muunnellulla menetelmällä (menetelmä D), jossa kaksi näkökenttää lasketaan lähellä valmisteeseen reunaa jonka jälkeen lasketaan neljä kenttää kohtisuoraan (Bain, 2002).



Kuva 2. Laskentamenetelmät (Kuusisto, 2013).

Leukosyyttien erittelylaskennan suorittamisen jälkeen tulokset ilmoitetaan prosentteina lasketuista soluista soluryhmien mukaisesti. Mikäli valmisteella esiin-  
tyy neutrofiilien nuoruusmuotoja, ne jaotellaan omiin ryhmiinsä. Myös mahdolliset erytroblastit eli punasolujen varhaismuodot ilmoitetaan lukumääränä laske-  
tuista soluista. (Bain, Lewis & Bates, 2006.)



### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, onko leukosyyttien erittelylaskennan prosenttiosuuksien välillä eroa käyttäen kahta eri laskentatapaa. Ensimmäisessä laskentatavassa (menetelmä A) leukosyytit lasketaan sivelyvalmisteen optimaaliselta alueelta edeten valmisteen alareunasta yläreunaan ja toisessa tavassa (menetelmä B) valmisteen ohuesta päästä paksua päätä kohti. Opinnäytetyön tarkoitus perustuu kirjallisuudessa esiintyviin eroihin leukosyyttien erittelylaskennan laskentatavoissa. Menetelmä A:n laskentatavan mukaan leukosyyttien erittelylaskennan virheellisten tulosten mahdollisuus pienenee (Carr & Rodak, 2009). Menetelmä B laskentatapa perustuu solujen epätasaiseen jakautumiseen sivelyvalmisteele, jolloin laskennasta tulee tarkempi käytettäessä tätä menetelmää (Mahlamäki, 2004). Tarkoituksena on selvittää erot näiden laskentatapojen välillä.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa empiiristä näyttöä kahden erittelylaskennan laskentatavan eroavaisuuksista.

Opinnäytetyön tutkimusongelma on:

- Millainen ero on leukosyyttien erittelylaskennan prosenttiosuuksissa käyttäen kahta eri laskentatapaa?

## 4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

### 4.1 Metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen opinnäytetyö. Kvantitatiivisen tutkimuksen keskeisiä piirteitä ovat aiemmat teoratiedot ja tutkimukset aiheesta sekä päätelmien ja tulosten havainnollistaminen tilastollisten menetelmien avulla (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara, 2003).

Kvantitatiiviselle tutkimukselle on tyypillistä myös otannan suunnittelu, joka koostuu tutkimusmenetelmän valinnasta, perusjoukosta sekä lopullisesta otoksesta, joka vastaa riittävän hyvin tutkimusongelmaan (Vilkkä, 2005). Edustava otoskoko koostuu perusjoukon ominaisuuksista, koosta ja tutkimuksen tarkkuudesta (Vilkkä, 2005). Tässä opinnäytetyössä otoskooksi valittiin  $n=90$ , jonka katsottiin olevan riittävän edustava kuvaamaan tutkimusongelmaa.

Tässä opinnäytetyössä aiemman teorian ja tutkimustiedon pohjalta suoritetaan työn empiirinen osuus eli leukosyyttien erittelylaskenta. Tutkimustulokset ovat numeerisessa muodossa, mikä on kvantitatiiviselle tutkimukselle tyypillistä. Tuloksia verrataan aikaisempaan teoratietoon sekä tutkimuksiin aiheesta, joiden avulla muodostetaan opinnäytetyön johtopäätökset.

### 4.2 Eettiset lähtökohdat

Tähän opinnäytetyöhön haettiin toimeksianto bioanalytiikan koulutuspäälliköltä ennen empiirisen vaiheen suorittamista. Opinnäytetyön teossa käytetyissä näytteissä ei käytetty henkilötietoja vaan näytteet ja sivelyvalmisteet numeroitiin juoksevilla numerolla. Tutkimukseen osallistuvat antoivat tietoisensaustumuksensa, sillä tutkimusetiikan mukaan tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä edellytetään suostumuksen antamista, joka on annettu perehtyneesti eli tutkittava tietää mitä tutkimuksessa tulee tapahtumaan ja hän ymmärtää kyseisen informaation. Suostumuksen tulee olla myös vapaaehtoista. Tietoisella suostumuk-

sella estetään ihmisten manipuloiminen tutkimuksessa. (Hirsjärvi ym., 2003.) Tässä opinnäytetyössä verinäytteenottoon osallistuvat opiskelijat täyttivät suostumuslomakkeen (Liite 2.), jossa kerrotaan opinnäytetyön tarkoituksesta ja anonymiteetistä. Opinnäytetyön tekijä laati suostumuslomakkeen itse tutkimusta varten. Täytetyt suostumuslomakkeet säilytettiin asianmukaisesti, jotta tutkimukseen osallistuvien nimet eivät käy ilmi ulkopuolisille.

Opinnäytetyössä noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä eli noudatetaan eettisesti kestäviä tiedonhankintamenetelmiä ja tutkimusmenetelmiä. Opinnäytetyön tekemisessä noudatetaan huolellisuutta ja tarkkuutta eikä tietoja vääristellä. Opinnäytetyön valmistuttua käytetyt aineistot hävitetään. (Vilkka, 2005.) Tässä opinnäytetyössä tarvittava tieto kerättiin luotettavasta alan kirjallisuudesta. Opinnäytetyön tekemisessä materiaalien ja menetelmien kanssa toimittiin huolellisesti ja tarkasti, jotta tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia. Saatuja tuloksia tai tietoa ei vääristelty.

#### 4.3 Toteutus

Opinnäytetyöprosessi alkoi keväällä, jolloin opinnäytetyölle tehtiin tutkimussuunnitelma. Tutkimussuunnitelman pohjalta laadittiin opinnäytetyön teoreettinen osuus kesän 2013 aikana. Opinnäytetyölle haettiin toimeksianto bioanalytiikan koulutuspäälliköltä syksyllä 2013 ennen työn empiirisen vaiheen suorittamista, joka valmistui syksyn 2013 aikana. Opinnäytetyön empiirinen osuus suoritettiin Turun ammattikorkeakoululla bioanalytiikan koulutusohjelman tiloissa.

Opinnäytetyön empiirisessä osuudessa kerättiin verinäytteitä bioanalytiikan opiskelijoista, joita oli kutsuttu verinäytteille koulun sähköpostin avulla. Opiskelijat täyttivät verinäytteille tullessaan suostumuslomakkeen (Liite 2.), jonka avulla he vahvistivat vapaaehtoisensa osallistumisensa. Näytteenotossa opiskelijoista otettiin yksi 3 ml:n EDTA-putkellinen verta, joka täytettiin putken täyttötilavuuteen asti ja näytteet sekoitettiin välittömästi rauhallisesti käännettäessä. Verinäytteitä otettiin kahtena päivänä. Verinäytteistä valmistettiin opinnäytetyötä varten sivelyvalmisteita, joita tehtiin yhteensä 90 (n=90). Verinäytteitä tuli kaikkiaan 30

kappaletta, jolloin yhdestä näytteestä valmistettiin 3 sivelyvalmistetta, jotka merkittiin juoksevin numeroin. Sivelyvalmisteet tehtiin välittömästi näytteenoton jälkeen.

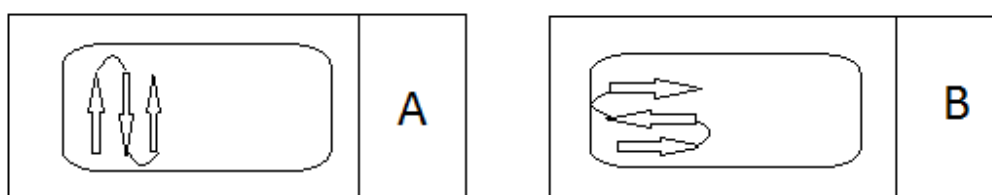
Sivelyvalmisteiden valmistamisessa käytettiin kertakäyttöisiä objektilaseja sekä muovisia vetolaseja. Verinäyte sekoitettiin hyvin kääntelemällä rauhallisesti ennen valmisteen tekoa. Veripisaran annosteluun käytettiin annostelijaa. Valmisteet tehtiin oikeaoppisesti noin 30–45 asteen kulmassa ja ilmakuivattiin. Valmisteet numeroitiin heti sivelyn jälkeen. Mahdolliset epäonnistuneet sivelyt hylättiin, jolla varmistettiin mahdollisimman luotettavien ja laadukkaiden sivelyvalmisteiden käyttö tutkimuksessa.

Sivelyvalmisteet kiinnitettiin metanolissa 10 minuuttia näytteenottopäivänä. Valmisteet myös värjättiin May-Grünwald-Giemsan –värjäyksellä saman päivän aikana. Sekä kiinnitys että värjäys suoritettiin bioanalytiikan koulutusohjelman tiloissa. Väriliukset valmistettiin Reagena Oy:n ohjeiden ja värireagenssien mukaisesti (Liite 3.). Värjäyksessä valmisteet olivat 5 minuuttia May-Grünwaldin värjäysliuoksessa, 12 minuuttia Giemsan värjäysliuoksessa ja lopulta sivelyvalmisteet huuhdeltiin 30 sekunnin sarjoissa kaksi kertaa. Värjätyt valmisteet ilma-kuivattiin ja asetettiin tarjottimelle.

Sivelyvalmisteille suoritettiin manuaalinen leukosyyttien erittelylaskenta käyttäen hyödyksi Turun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tilojen mikroskooppia. Sivelyvalmisteet laskettiin käyttäen 50x –öljyimmersio-objektiivia ja laskien 200 leukosyyttiä. Laskennassa käytettiin apuna solulaskentaa varten kehitettyä laskentalaitetta. Ennen erittelylaskennan aloittamista ja mikroskopointia, mikroskoopille tehtiin Köhlerin valaistuksen säätö (Liite 1.). Valmisteiden värjäytyvyyttä ja laadukkuutta tarkasteltiin myös sekä makroskooppisesti että mikroskooppisesti ennen laskennan suorittamista (ks. s. 14).

Jokaisen sivelyvalmisteen optimaaliselta alueelta suoritettiin erittelylaskennat kahdella eri menetelmällä, jotka merkittiin menetelmä A:lla ja B:llä. Laskennan ensimmäinen näkökenttä, josta laskenta alkoi, määräytyi mikroskoopissa olevien koordinaattien perusteella ja lisäksi näkömuistin avulla. Tällöin kahden eri

laskennan lähtöpiste oli sama. Erittelylaskennassa noudatettiin kahta eri menetelmää, ensimmäisessä menetelmässä (A) leukosyytit laskettiin valmisteen optimaaliselta alueelta pystysuorassa edeten alhaalta ylöspäin kohti valmisteen paksua päätä, joka on Turun ammattikorkeakoulun käyttämä laskentatapa. Toisessa menetelmässä (B) leukosyytit laskettiin vaakasuorassa alhaalta ylöspäin kohti valmisteen yläreunaa (Kuva 3.).



Kuva 3. Laskentamenetelmät (Kuusisto, 2013)

Erittelylaskenta suoritettiin valmisteille useana eri päivänä ja niistä saadut tulokset kirjoitettiin tulosvihkoon järjestelmällisesti, jotta tulosten tarkasteleminen oli mahdollisimman helppoa. Tämän jälkeen leukosyyttien erittelylaskennasta saadut tulokset havainnollistettiin erilaisiin tilastollisiin menetelmiin.

Tulosten havainnollistamisessa käytettiin sekä Excel- että SPSS -ohjelmaa. Tulokset vietiin Excel-ohjelmaan, jossa ne jaoteltiin ensin menetelmä A:han ja B:hen soluryhmien mukaisesti. Tuloksista tehtiin tunnuslukuja, joista valittiin keskiarvo, keskihajonta sekä minimi ja maksimi. Tuloksista tehtiin myös parierojen t-testi neutrofiileille, lymfosyyteille ja monosyyteille sekä Wilcoxonin testi eosinofiileille. Eosinofiileille tehtiin myös Pearsonin korrelaatiotesti, sillä Wilcoxonin testi ei korrelaatiota havainnollista. Eri soluryhmien mukaisesti tehtiin myös sirontakuviot ja regressiosuora. Basofiilien esiintyminen tutkituissa valmis-teissa (n=90) oli niin vähäistä, että niiden eroavaisuuksia ei havainnollistettu.

Tulosten tarkastelussa käytetty parierojen t-testi on usein käytetty menetelmä kahden riippuvan otoksen keskiarvojen vertailuun. Parierojen t-testi on parametrisen testi, joka edellyttää muuttujilta vähintään välimatka-asteikkoa. Sen avulla voidaan vertailla keskiarvoja kahdesta toisistaan riippumattomasta ryhmästä. Parierojen t-testiä käytetään tilanteissa, joissa halutaan tehdä vertailua samaa tulosta kahdessa eri tilanteessa tai tehtävässä. (Nummenmaa, 2004.) Opinnäytetyössä parierojen t-testillä verrattiin A ja B –menetelmiä jokaisella soluryhmällä. Parierojen t-testi suoritettiin ensin kaikille soluryhmille, mutta lopulta t-testi suoritettiin vain neutrofiileille, lymfosyyteille ja monosyyteille. Wilcoxonin testi on epäparametrinen, toistettujen mittausten t-testin eli parierojen t-testin vastine, jossa arvot eivät välttämättä noudata normaalijakaumaa (Nummenmaa, 2004). Wilcoxonin testi suoritettiin ainoastaan eosinofiileille. Sekä parierojen t-testistä että Wilcoxonin testistä saadaan muuttujille p-arvot, joilla mitataan sattuman mahdollisuutta kahden muuttujan välillä. P-arvon ollessa  $\leq 0,05$  tulos on tilastollisesti merkitsevä, mutta jos p-arvo on  $> 0,05$ , tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä. (Laininen, 2001). Parierojen t-testin kautta saadaan myös korrelaatiokertoimet tutkituille leukosyyteille, jotka mittaavat yhteisvaihtelua ja kahden muuttujan välistä lineaarisen yhteyden voimakkuutta. Mitä lähemmäs korrelaatiokertoimen arvo sijoittuu +1:tä, sitä voimakkaampi on muuttujien välinen korrelaatiokerroin. (Nummenmaa, 2004.). Tällöin toisen muuttujan arvojen kasvaessa myös toisen muuttujan arvot kasvavat. Mikäli korrelaatiokerroin on 0, riippuvuutta kahden muuttujan välillä ei esiinny. (Karjalainen, 2000.)

Eosinofiileille laskettiin Spearmanin korrelaatiokerroin, sillä Wilcoxonin testi ei erittele korrelaatiokerrointa. Spearmanin korrelaatiokerroin on epäparametrinen, järjestysasteikollisten muuttujien korrelaatiokerroin. Se mittaa havaintojen samanlaista järjestystä kahdella muuttujalla. Spearmanin korrelaatiokertoimessa muuttujilla on voimakas korrelaatio, mikäli arvo sijoittuu lähelle +1:tä. (Nummenmaa, 2004.)

## 5 TULOKSET

### 5.1 Neutrofiilien tulokset

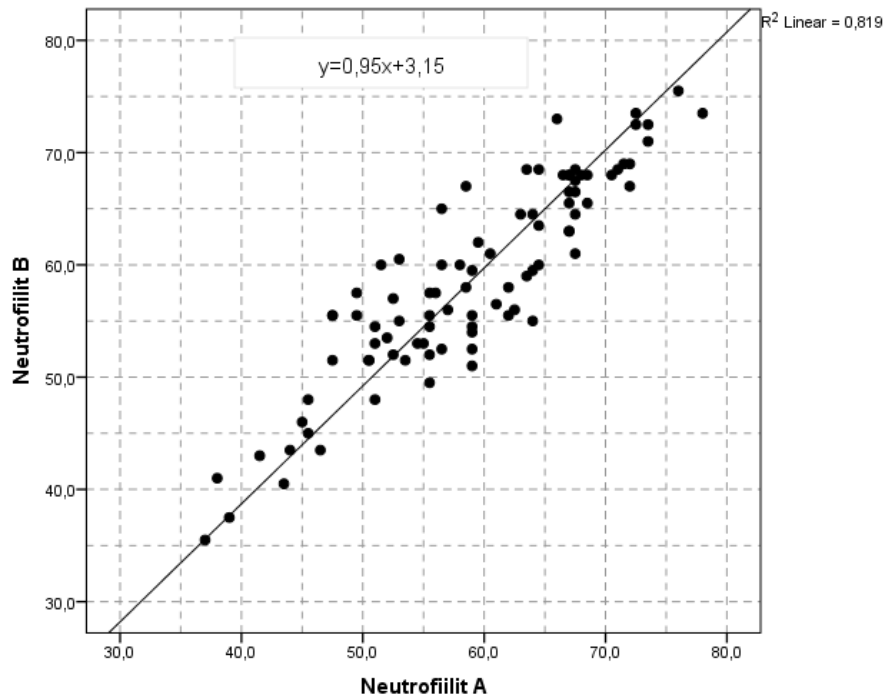
Neutrofiilien tuloksista laskettiin ensin tilastollisia tunnuslukuja, joista valittiin keskiarvo, keskihajonta sekä minimi ja maksimi. Tunnusluvuista tehtiin taulukko (Taulukko 1.), johon ne koottiin A- ja B-menetelmän mukaisesti. Lisäksi taulukon yhdistettiin parierojen t-testin kautta saatu p-arvo tunnuslukujen alapuolelle, jonka avulla saadaan selville tuloksen merkitsevyys.

Taulukko 1. Neutrofiilien tunnusluvut ja p-arvo

	Neutrofiilit A	Neutrofiilit B
<b>Keskiarvo</b>	59,0	58,7
<b>Keskihajonta</b>	9,3	8,9
<b>Minimi</b>	37	35,5
<b>Maksimi</b>	78	75,5
<b>Lukumäärä (N)</b>	90	90
<b>P-arvo</b>	0,445	

Taulukossa 1 *neutrofiilit A* tarkoittaa laskentatapaa A ja *neutrofiilit B* laskentatapaa B (ks. s. 21). Laskentatapojen välistä eroavaisuutta tutkittiin tekemällä parierojen t-testi, jolla saatiin p-arvoksi 0,445.

Neutrofiilien tuloksia A- ja B -laskentamenetelmillä tarkasteltiin myös sirontaku-  
vion ja regressiosuoran avulla (Kuvio 1.). Kuviossa x-akselilla on A-  
laskentatavan neutrofiilit ja y-akselilla B-laskentatavan neutrofiilit. A-  
laskentatavan neutrofiilit sijoitettiin x-akselille, sillä opinnäytetyössä A-  
laskentatapaa verrattiin B-laskentatapaan. Neutrofiileissä asteikkoväli on kym-  
menen yksikön välein.



Kuvio 1. Neutrofiilien sirontakuvio ja regressiosuora

## 5.2 Lymfosyyttien tulokset

Lymfosyyttien tulokset jaoteltiin Excel-taulukkoon A- ja B-laskentatapojen mukaisesti, jossa näkyvät niiden keskiarvot, keskihajonnat sekä minimi ja maksimi (Taulukko 2.). Taulukkoon yhdistettiin myös parierojen t-testin kautta saatu p-arvo tilastollisten tunnuslukujen alapuolelle.

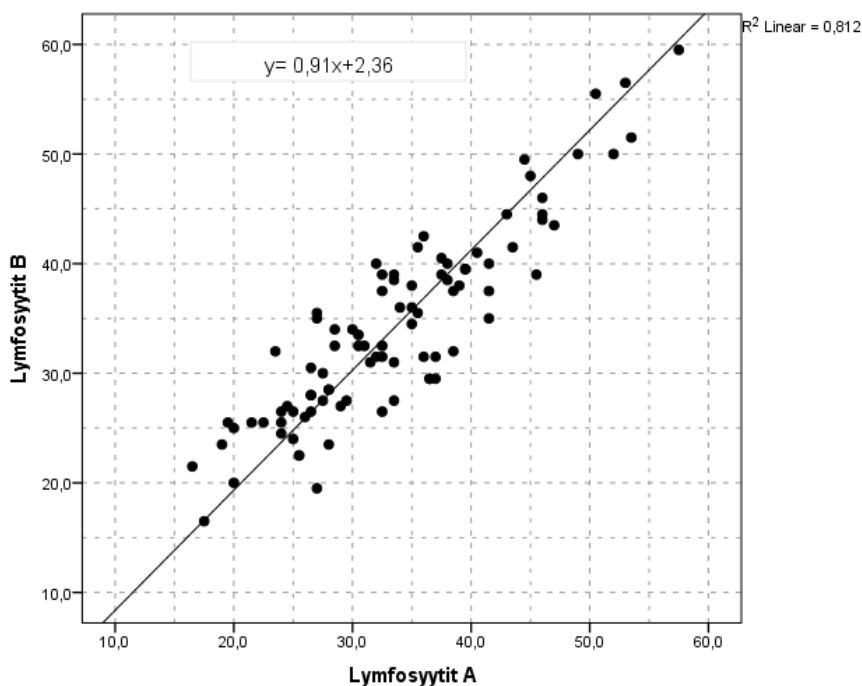
Taulukko 2. Lymfosyyttien tunnusluvut ja p-arvo

	Lymfosyytit A	Lymfosyytit B
<b>Keskiarvo</b>	33,6	34,2
<b>Keskihajonta</b>	8,9	8,7
<b>Minimi</b>	16,5	16,5
<b>Maksimi</b>	57,5	59,5
<b>Lukumäärä (N)</b>	90	90
<b>P-arvo</b>	0,136	



Taulukossa 2 *lymfosyytit A* kertoo A-menetelmällä laskettujen lymfosyyttien tunnusluvut ja *lymfosyytit B* laskentamenetelmä B:llä laskettujen lymfosyyttien tunnusluvut. Taulukkoon 2 on lisättyä myös A- ja B-laskentatavoilla laskettujen lymfosyyttien p-arvo.

Lymfosyyttien tuloksista laadittiin myös sirontakuvio, johon tehtiin regressiosuora. Kuviossa 2 on esitetty lymfosyyttien kuvaaja. Kuvioon asetettiin x-akselille A-laskentatavan lymfosyytit ja y-akselille B-laskentatavan lymfosyytit, sillä opinnäytetyössä A-laskentatapaa verrattiin B-laskentatapaan. Kuviossa lymfosyyttien asteikkoväli on kymmenen yksikön välein.



Kuvio 2. Lymfosititien sirontakuvio ja regressiosuora

### 5.3 Monosyyttien tulokset

Monosyytit havainnollistettiin muiden leukosyyttien tavoin Excel-taulukkoon, jossa havainnollistettiin A- ja B-laskentatapojen keskiarvot, keskihajonnat sekä

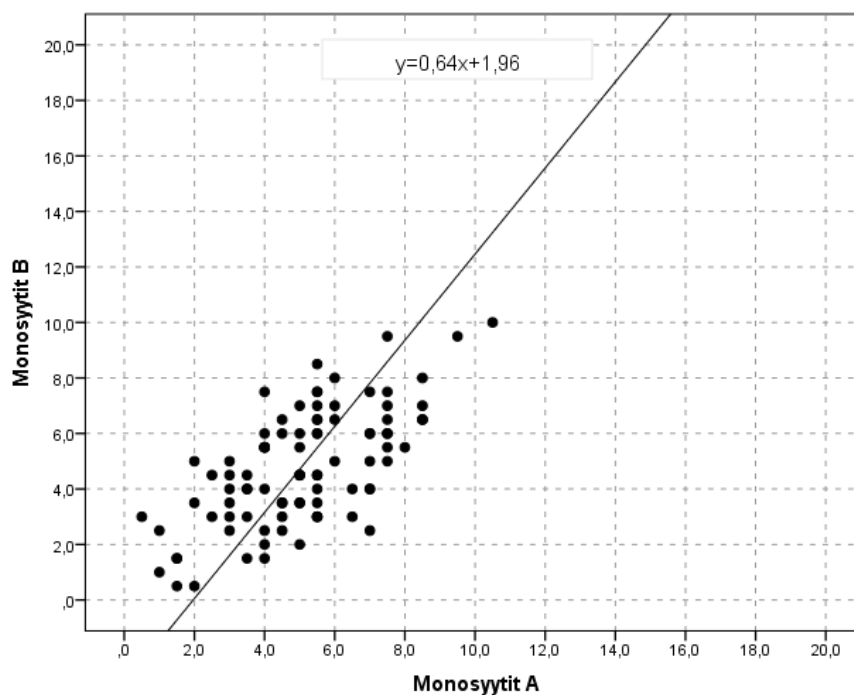
minimi ja maksimi (Taulukko 3.). Taulukkoon lisättiin myös parierojen t-testin avulla saatu p-arvo tilastollisten tunnuslukujen alapuolelle.

Taulukko 3. Monosyyttien tunnusluvut ja p-arvo

	Monosyytit A	Monosyytit B
<b>Keskiarvo</b>	5,1	4,8
<b>Keskihajonta</b>	2,0	2,1
<b>Minimi</b>	0,5	0,5
<b>Maksimi</b>	10,5	10
<b>Lukumäärä (N)</b>	90	90
<i>P-arvo</i>	0,161	

Taulukossa 3 *monosyytit A* kuvastaa A-menetelmän laskentatapaa ja *monosyytit B* puolestaan B-menetelmän laskentatapaa. Taulukkoon on lisätty A- ja B-laskentatapojen eroavaisuutta monosyyttien tuloksissa havainnollistava p-arvo on 0,161.

Monosyyttien tuloksista tehtiin myös sirontakuviot ja regressiosuora (Kuvio 3.). Kuviossa x-akselille sijoitettiin A-menetelmällä saadut monosyytit ja y-akselille B-menetelmällä saadut leukosyytit. Monosyyttien kuviossa asteikkoväli on kahden yksikön välein.



Kuvio 2. Monosyyttien sirontakuvio ja regressiosuora

#### 5.4 Eosinofiilien tulokset

Eosinofiilien tulokset havainnollistettiin muiden leukosyyttien tavoin luomalla niiden tuloksista keskiarvot, keskihajonnat sekä minimi ja maksimi (Taulukko 4.). Taulukossa on eritelty eosinofiilien tunnusluvut A-menetelmällä ja B-menetelmällä.

Taulukko 4. Eosinofiilien tunnusluvut

	Eosinofiilit A	Eosinofiilit B
<b>Keskiarvo</b>	2,1	2,1
<b>Keskihajonta</b>	1,5	1,7
<b>Minimi</b>	0	0
<b>Maksimi</b>	9,5	8,5
<b>Lukumäärä (N)</b>	90	90

Laskentamenetelmien merkitsevyyttä havainnollistava p-arvo laskettiin muiden leukosyyttien tuloksista poiketen Wilcoxonin testin avulla, jonka avulla saatiin p-arvoksi 0,829 (Taulukko 5.).

Taulukko 5. Wilcoxonin testi eosinofiileille

Ranks		N	Mean Rank	Sum of Ranks
eosino_B - eosino_A	Negative Ranks	40 <sup>a</sup>	31,98	1279,00
	Positive Ranks	30 <sup>b</sup>	40,20	1206,00
	Ties	20 <sup>c</sup>		
	Total	90		

a. eosino\_B < eosino\_A

b. eosino\_B > eosino\_A

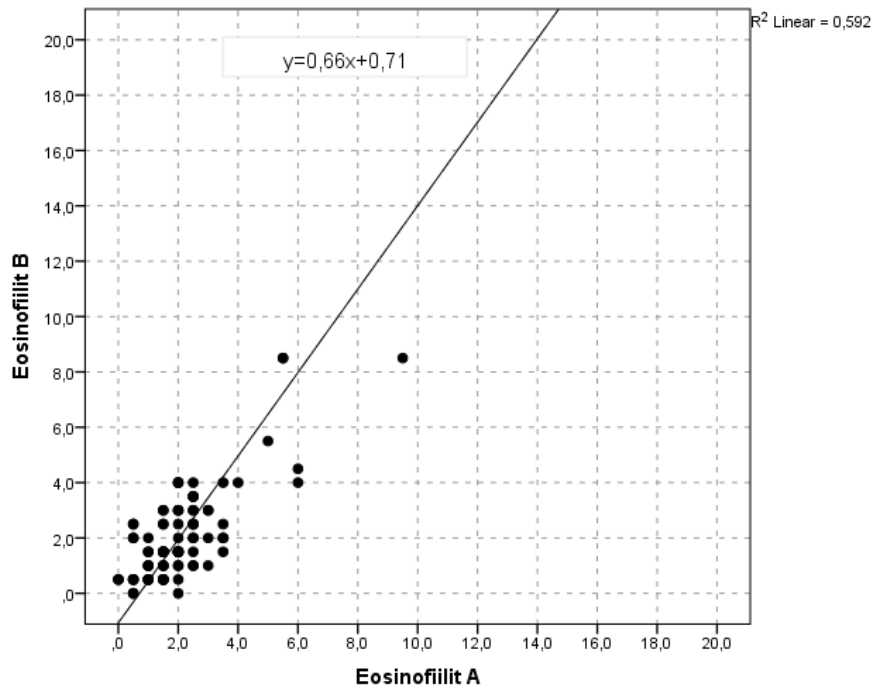
c. eosino\_B = eosino\_A

Test Statistics <sup>a</sup>	
	eosino_B - eosino_A
Z	-,216 <sup>b</sup>
<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>	<b>,829</b>

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on positive ranks.

Eosinofiilien tuloksista laadittiin myös sirontakuvi ja regressiosuora (Kuvio 4), jossa x-akselilla on A-laskentatavalla lasketut eosinofiilit ja y-akselilla B-laskentatavalla lasketut eosinofiilit. Kuvaajassa asteikkoväli on esitetty kahden yksikön välein.



Kuvio 3. Eosinofiilien sirontakuvio ja regressiosuora

Taulukossa 6 on esitetty eosinofiilien korrelaatiokerroin, joka on 0,635. Korrelaatiokerroin saatiin Spearmanin korrelaatiokertoimen avulla.

Taulukko 6. Spearmanin korrelaatio eosinofiileille

Correlations			
		eosino_A	eosino_B
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1,000	,635**
	eosino_A Sig. (2-tailed)	.	,000
	N	90	90
	Correlation Coefficient	,635**	1,000
	eosino_B Sig. (2-tailed)	,000	.
	N	90	90

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## 6 POHDINTA

Manuaalinen leukosyyttien erittelylaskenta on käytetty hematologinen tutkimusmenetelmä niin pienissä kuin suurissa laboratorioissa. Leukosyyttien erittelylaskenta on nykyään kuitenkin automatisoitua, jolloin manuaalisen laskennan suorittaminen keskittyy ainoastaan morfologialtaan epänormaalien solujen tunnistamiseen ja laskemiseen sekä leukosytoosin tai leukopenian selvittelyyn. Tällöin on kiinnitettävä erityistä huomiota manuaalisen erittelylaskennan luotettavuuteen ja tunnistuskykyyn. Manuaalista ja automaattista erittelylaskentaa on myös vertailtu keskenään Yhdysvalloissa julkaistussa tutkimuksessa, jossa saatiin selville että manuaalista erittelylaskentaa pystytään vähentämään automaattilaitteiden avulla, joka on laboratoriolle tehokkaampaa ja nopeampaa (Novis ym., 2006). Tutkimuksesta voidaan päätellä manuaalisen erittelylaskennan olevan edelleen tärkeä hematologinen tutkimusmenetelmä.

Opinnäytetyön tutkimusongelmana oli tutkia eroa leukosyyttien erittelylaskennan prosenttiosuuksissa kahden eri laskentamenetelmän välillä (A ja B). Tarkoituksena oli osoittaa laskentamenetelmien mahdollinen eroavaisuus suorittamalla erittelylaskenta sivelyvalmisteille (n=90) kahdella eri menetelmällä. Tavoitteena oli tuottaa empiiristä näyttöä näistä kahdesta laskentatavasta ja niiden merkitsevyydestä.

### 6.1 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tuloksista huomattiin, ettei A- ja B-laskentamenetelmän välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa, sillä parierojen t-testin ja Wilcoxonin testin avulla saadut p-arvot olivat kaikilla leukosyyteillä  $>0,05$ . Jokaisen leukosyyttiryhmän tunnuslukuja havainnollistavissa taulukoissa ei esiintynyt tunnuslukujen välillä suurta eroa vaan ne olivat samankaltaisia. Etenkin keskiarvot ja keskihajonnot olivat samankaltaisia laskentamenetelmien välillä kaikilla leukosyyteillä.

Neutrofiilit ja lymfosyytit edustavat suurinta osaa leukosyyttien erittelylaskennan tuloksissa, joten niiden tarkasteluun kiinnitettiin eniten huomiota. Neutrofiilien ja

lymfosyyttien kuvioista (Kuvio 1. ja Kuvio 2.) voidaan huomata tulosten sijoittuvan lähelle regressiosuoraa. Suorilla oli myös vahva positiivinen lineaarinen korrelaatio, sillä neutrofiileillä korrelaatiokerroin oli 0,905 ja lymfosyyteillä 0,901 (Liite 4.), sillä arvot olivat lähellä +1.

Vaikka laskentatapojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa, tuloksista voidaan kuitenkin huomata, että neutrofiilien maksimi on suurempi A-menetelmällä ja lymfosyyttien maksimi puolestaan B-menetelmällä (Taulukko 1. ja 2.). Tällöin A-menetelmällä saatiin neutrofiileistä suurempia tuloksia kuin B-menetelmällä ja lymfosyyteissä puolestaan toisin päin. Tuloksista voidaan päätellä eron johtuvan solujen erilaisesta jakautumisesta sivelyvalmisteelle niiden ominaisuuksien mukaisesti, jolloin neutrofiilit painottuvat valmisteeseen häntäpäätä ja lymfosyytit edustavat valmisteeseen paksussa päässä. A-laskentamenetelmässä laskenta keskittyi lähemmäs valmisteeseen häntäpäätä ja B-laskentamenetelmässä sekä häntäpäässä että lähellä paksua päätä. Eroavaisuudessa oli siis samankaltaisuutta teoreettisen taustan kanssa (ks. Mahlamäki, 2004). Ero neutrofiilien ja lymfosyyttien tuloksissa ei ollut kuitenkaan merkitsevää.

Tuloksista voidaan huomata myös monosyyttien ja eosinofiilien sirontakuvioiden hajanaisuus, sillä arvot eivät kuvaajan mukaan (Kuvio 3. ja Kuvio 4.) asetu regressiosuoran lähelle ja näin ollen tulosten välillä olisi hajontaa. Kuitenkin monosyyttien ja eosinofiilien p-arvojen avulla voidaan päätellä että laskentatapojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Sirontakuvioiden hajanaisuus johtuu kuvioiden erilaisista yksikköväleistä, sillä neutrofiileillä ja lymfosyyteillä yksikköväli on kymmenen, monosyyteillä ja eosinofiileillä kaksi. Pienempi yksikköväli vääristää kuvaajaa, jolloin todellisuudessa hajanaisuus ei ole suurta. Tulosten hajanaisuus kuvioissa voi kuitenkin johtua myös sattumasta. Monosyyttien kuvioista voidaan huomata myös, että suoralla on positiivinen lineaarinen korrelaatio ja korrelaatiokerroin on 0,656 (Liite 4.). Eosinofiilien kuviossa on myös positiivinen lineaarinen korrelaatio ja korrelaatiokerroin tehtiin Spearmanin korrelaatiokertoimen avulla, jolloin  $r=0,635$  (Taulukko 6.).

Eosinofiilien laskentamenetelmiä verrattaessa käytettiin parierojen t-testin sijasta Wilcoxonin testiä, jotta saataisiin p-arvo. Aluksi eosinofiileille tehtiin normaalisti parierojen t-testi, mutta huomattiin kuitenkin, että niiden jakauma oli vino, jolloin parierojen t-testiä ei niille voi suorittaa, sillä parierojen t-testi on keskiarvoja havainnollistava testi. Wilcoxonin testi on parierojen t-testin vastine, joka ei edellytä tutkittavalta asialta normaalijakaumaa. (Nummenmaa, 2004.) Tällöin Wilcoxonin testi havainnollisti paremmin eosinofiileja. Eosinofiilien korrelaatiokertoimen saamiseksi tehtiin myös Spearmanin korrelaatiotesti, sillä se on myös epäparametrinen, jolloin se havainnollisti paremmin eosinofiilien todellista korrelaatiota (Nummenmaa, 2004).

Basofiilien tuloksia ei opinnäytetyössä havainnollistettu, sillä niiden esiintyminen laskennassa oli hyvin pientä, joten havainnollistaminen olisi ollut vaikeaa. Eroa ei laskentatapojen välillä kuitenkaan ollut, sillä laskennassa basofiilejä esiintyi 0,5-1,0 % lasketuista leukosyyteistä. Erittelylaskennassa basofiilit laskettiin kuitenkin normaalisti.

Opinnäytetyön tutkimustuloksista voidaan päätellä, ettei laskentatavalla ole tilastollisesti merkitsevää eroa, joten manuaalinen leukosyyttien erittelylaskenta voidaan suorittaa joko laskentatavalla A tai B. Tutkimusongelmaan saatiin siis vastaus. Tutkimustuloksia voi heijastaa teoreettiseen taustaan, jossa laskentatavoille on esitetty erilaiset laskentatavat (ks. Carr & Rodak, 2009; Mahlamäki, 2004). Tutkimustulokset ovat siis yhtenäisiä teoreettisen taustan kanssa. Tärkeintä laskentaa suorittaessa on pysytellä valmisteen optimaalisella alueella, jolloin solujen epätasainen jakautuminen ei vaikuta etenäkään neutrofiilien ja lymfosyyttien prosenttiosuuksiin.

## 6.2 Luotettavuuden arviointi

Tutkimusta voidaan arvioida sen pätevyyden eli validiteetin avulla. Validius tarkoittaa tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä tutkimuksessa kuuluu mitata. Pätevässä tutkimuksessa ei siis saisi olla systemaattisia virheitä. (Vilkkä, 2005.) Tässä opinnäytetyössä tutkimus suunniteltiin etukäteen hyvin,



jolloin ehkäistiin systemaattisia virheitä. Tutkimusmenetelmä mittasi hyvin tutkittavaa asiaa eli kahden laskentatavan välistä eroa leukosyyttien erittelylaskennassa.

Opinnäytetyössä verinäytteistä valmistettiin sivelyvalmisteita, joiden valmistusvaiheessa kiinnitettiin huomiota mahdollisimman laadukkaaseen tulokseen. Heikkolaatuiset valmisteet, kuten viiruiset ja roskaiset, hylättiin heti, jolloin varmistettiin tutkimustulosten luotettavuus. Opinnäytetyön tutkija valmisti sivelyvalmisteet itse, jolloin valmisteista tuli samankaltaisia. Sivelyvalmisteet värjättiin samana päivänä ja värjäysliuokset valmistettiin ohjeiden mukaisesti. Värjäys tapahtui kahtena eri päivänä, jolloin kiinnitettiin huomiota valmisteiden värjäytyvyyden vaihteluun. Sekä makroskooppisen että mikroskooppisen tarkastelun seurauksena huomattiin, ettei värjäytyvyydessä ole silmiinpistävää eroa eri värjäyskertojen välillä, joka vaikuttaa olennaisesti tutkimuksen luotettavuuteen, sillä solujen morfologinen tunnistuskyky oli molempien värjäyskertojen valmisteissa yhtä helppoa.

Opinnäytetyön luotettavuutta lisäsi se, että tutkija suoritti itse kaikki tutkimuksen vaiheet sivelyvalmisteiden teosta leukosyyttien erittelylaskentaan. Tällöin riski eroavaisuuksiin valmisteiden laadussa sekä morfologisessa tunnistamisessa ja laskennassa pieneni. Ennen työn empiiristä vaihetta tutkija perehtyi teoreettiseen viitekehykseen hyvin ja suunnitteli työn, jotta tutkimuksen vaiheet ja menetelmät olisivat samanlaisia, sillä tutkimuksen teko kesti useita päiviä. Valmisteet tehtiin tuoreesta EDTA-verestä kolmen tunnin sisällä näytteenotosta (ks. Lewis & Tatsumi, 2006) ja ne värjättiin tuoreita reagensseja käyttäen. Laskenta suoritettiin sivelyvalmisteille vain kerran, mutta epäselvissä tapauksissa laskenta varmistettiin laskemalla valmiste kahteen kertaan. Tulokset kirjattiin välittömästi ylös ja tarkistettiin. Tutkimuksessa käytetty otos (n=90) katsottiin olevan myös riittävän edustava vastaamaan tutkimusongelmaan.

Opinnäytetyössä käytettiin mahdollisimman tuoretta tietoa alan kirjallisuudesta, mutta myös hieman vanhempaa kirjallisuutta. Vanhemman kirjallisuuden tieto ei kuitenkaan poikennut uudemmassa tiedosta, joten niitä voitiin käyttää. Lähteitä käytettiin monipuolisesti ja mukana oli myös runsaasti ulkomaalaista lähdekirjal-

lisuutta. Lähteiden tieto arvioitiin kriittisesti ja mukaan otettiin vain luotettavia lähteitä.

Tutkimuksen toistettavuutta pohtiessa puhutaan reliabeeliudesta, jolla tarkoitetaan mittaustulosten toistettavuutta ja sen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Toistettavassa tutkimuksessa eri tutkimuskerroilla saadaan aina sama tulos. (Hirsjärvi ym., 2004; 216.) Tämä opinnäytetyö on osittain toistettava tutkimus, sillä mikäli tutkimus tehdään uudelleen, tuloksena saataisiin samankaltaisia tuloksia. Leukosyyttien arvot eivät kuitenkaan olisi samanlaisia, jolloin tulokset olisivat hieman erilaisia, mutta tilastollisesti tulos ei olisi kuitenkaan merkitsevä. Opinnäytetyön toistettavuuteen saattaa vaikuttaa monosyyttien ja eosinofiilien tulokset, sillä niiden tulokset saattoivat johtua sattumasta.

Tämän opinnäytetyön jatkotutkimusaiheena voisi olla tutkimuksen suorittaminen vielä suuremmalla aineistolla, jotta voitaisiin varmistua laskentamenetelmien eroista. Toisaalta tutkimusaiheena voisi olla toisten tai useiden eri laskentamenetelmien (ks. s. 16) välisen eron selvittäminen leukosyyttien erittelylaskennassa. Tutkimuksesta voitaisiin saada empiiristä lisätietoa laskentamenetelmien vaikutuksesta leukosyyttien erittelylaskennan prosenttiosuuksiin. Kolmantena jatkotutkimusaiheena voisi vertailla automaattilaitteen ja manuaalisen erittelylaskennan tuloksia.

Opinnäytetyössä saatiin tuotettua empiiristä näyttöä laskentatapojen eroavaisuuksista ja myös tutkimusongelmaan vastattiin. Tutkimus oli mielenkiintoinen ja se palveli omaa ammatillista kehitystäni ja oppimistäni.

## LÄHTEET

- Abramowitz M. 2003. Microscope. Basics and beyond. Basics and beyond series. Vol 1. s. 27-31. NY: Olympus America Inc. Viitattu 30.7.2013.  
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/pdfs/basicsandbeyond.pdf>
- Bain B. J. 2002. Blood Cells. A practical guide. Third edition. The Blackwell Science. India:Thomson Press Ltd.
- Bain B. J. 2006. Blood cell morphology in health and disease. Teoksessa Dacie and Lewis. Practical haematology. Tenth Edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.
- Bain B. J. & Lewis S. M. 2006. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. Teoksessa Dacie and Lewis. Practical haematology. Tenth Edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.
- Carr J. H. & Rodak B. F. 2009. Clinical hematology atlas. Third Edition. Saunders Elsevier.
- Henley A.; Moore G. & Knight G. 2010. Introduction to haematology. Teoksessa Haematology. Moore G, Knight G. & Blann A. Fundamentals of biomedical science. Oxford University press: New York.
- Hirsjärvi S.; Remes P. & Sajavaara P. 2003. Tutki ja kirjoita. Kustannusosakeyhtiö Tammi: Helsinki.
- Hoffbrand A. V. & Moss P. A. H. 2011. Essential haematology. Sixth edition. Wiley-Blackwell.
- Karjalainen L. 2000. Tilastomatematiikka. 7. painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Laininen P. 2001. Tilastollisen analyysin perusteet. 2. painos. Helsinki: Oy Yliopistokustannus/Otatieto.
- Lewis S. M. 2006. Appendices. Teoksessa Dacie and Lewis. Practical Haematology. Tenth Edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.
- Lewis S. M.; Bain B.J & Bates I. 2006. Basic haematological techniques. Teoksessa Dacie and Lewis. Practical Haematology. Tenth Edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.
- Lewis S. M. & Tatsumi N. 2006. Collection and handling of blood. Teoksessa Dacie and Lewis. Practical Haematology. Tenth Edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.
- Mahlamäki E. K. 2004. Veren kuvan tutkimukset. Teoksessa Kliiniset laboratoriotutkimukset. Penttilä I. (toim.). Porvoo: WS Bookwell Oy.

Nienstedt W.; Hänninen O.; Arstila A & Björkqvist S-E. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. WSOY: Helsinki.

Novis D. A.; Walsh M.; Wilkinson D. St. Louis M. & Ben-Ezra J. 2006. Laboratory productivity and the rate of manual peripheral blood smear review. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. Vol 136. 596-601. Viitattu 15.8.2013.  
<http://web.ebscohost.com.ezproxy.turkuamk.fi/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=2644a94f-adb7-4190-b45c-1afb966e0d2f%40sessionmgr114&vid=1&hid=121>

Nummenmaa L. 2004. Käyttäytymistieteiden tilastolliset menetelmät. Kustannusosakeyhtiö Tammi: Vammala.

Reagena Oy. 2003. May-Grünwald-Giemsa. Värjäysliuokset. Viitattu 5.7.2013.  
[http://www.reagena.fi/www/en/products/pdf/instructions/MGG\\_fin.pdf](http://www.reagena.fi/www/en/products/pdf/instructions/MGG_fin.pdf)

Savolainen E-R. 2007. Verinäytteet ja verenkuvatutkimukset. Teoksessa Veritaudit. Ruutu T. ym. (toim.). Duodecim. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Siitoinen S., Jansson S-E. 2007. Morfologiset tutkimukset. Teoksessa Veritaudit. Ruutu T. ym. (toim.). Duodecim. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Siitonen T. & Koistinen P. 2007. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Teoksessa Veritaudit. Ruutu T. ym. (toim.). Duodecim. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Vilkka H. 2005. Tutki ja kehitä. Kustannusosakeyhtiö Tammi: Helsinki.

Vilpo J. 2010. Verisolujen rakenne ja funktiot. Teoksessa Ilmari Palvan veritaudit. Vilpo J. (toim.). Medivil Oy: Vammala.

## Köhlerin valaistuksen säätö

1. Sytytä valo mikroskooppiin ja valitse 10x –suurentava objekti.
2. Aseta näyte näytepöydälle ja etsi näkökenttä käyttämällä mikro- ja makrosäätöruuvainta.
3. Sääda okulaarien välinen etäisyys silmillesi sopivaksi niin, että näkökenttä näkyy yhtenäisenä.
4. Sulje kenttähimmennin melkein kokonaan ja nosta kondensori yläasentoon sen verran, että alueella näkyvät reunat ovat teräviä. Valaistun alueen tulee näyttää tarkkarajaiselta monikulmiolta.
5. Keskiöi valaistu alue käyttämällä kondensorin keskiöintinuppeja niin, että valaistu alue on keskellä mikroskoopissa näkyvää näkökenttää.
6. Avaa kenttähimmennintä niin, että sen rajat poistuvat juuri ja juuri näkökentästä.
7. Ota toinen okulaari irti helakkeestaan ja katso tyhjään helakkeeseen ja sääda apertuurihimmentimen avulla alue niin, että 2/3 näkökentästä on valaistuna. Aseta sen jälkeen okulaari takaisin helakkeeseen.

(Abramowitz, 2003, Lewis, 2006)

## Leukosyyttien erittelylaskennan tulosten vertailu

### Suostumuslomake

*Pyydän Teitä osallistumaan opinnäytetyöhöni, jonka tarkoituksena on selvittää, miten leukosyyttien erittelylaskennan prosentuaaliset osuudet eroavat käytettäessä kahta eri laskentatapaa. Tarkoituksenani on tehdä saaduista näytteistä sivelyvalmisteet ja suorittaa leukosyyttien erittelylaskenta käyttäen kahta eri laskentatapaa, joissa ensimmäisessä solut lasketaan Turun ammattikorkeakoulun opetuksen mukaisesti valmisteiden alareunasta yläreunaan ja toisessa laskentatavassa solut lasketaan valmisteiden ohuesta päästä edeten valmisteiden paksuun päähän. Opinnäytetyötäni varten tarvitsen Teistä verikokeen, johon vaaditaan ainoastaan yksi putkellinen verta.*

*Tutkimus suoritetaan anonymiteettia noudattaen, eli Teidän henkilötietojanne ei tule ilmi missään vaiheessa tutkimusta tai sen tuloksissa. Näytteet ja sivelyvalmisteet merkitään juoksevilla numeroinnilla ja opinnäytetyön valmistuttua kaikki käytettävä materiaali ja tieto hävitetään asianmukaisesti.*

*Tutkimukseen osallistuminen on Teille täysin vapaaehtoista ja voitte keskeyttää osallistumisenne missä vaiheessa tutkimusta tahansa. Saatte myös tietää oman erittelylaskennan tuloksenne, mikäli niin haluatte. Laittakaa tällöin rasti ruutuun ja sen jälkeiselle viivalle ryhmätunnusenne.*

**Olen ymmärtänyt tutkimuksen tarkoituksen ja suostun osallistumaan tutkimukseen**

---

**Nimi ja allekirjoitus**

**Pvm**

☐ Haluan vastauksen erittelylaskennasta, ryhmätunnus: \_\_\_\_\_

---

**Tutkijan nimi ja allekirjoitus**

**Päivämäärä**

## **MGG-värijäysliuoksen valmistus**

1. Valmista puskuroitu vesi. Laimenna fosfaattipuskuria aquaan suhteessa 1:20. (100ml fosfaattipuskuria, 1900ml aquaa).
2. Valmista May-Grünwaldin värijäysliuos. Lisää 180ml May-Grünwaldin reagenssia (Reagen Oy) 120 ml:aan puskuroitua vettä.
3. Valmista Giemsan liuos. Laimenna 42 ml Giemsan reagenssia (Reagen Oy) 258 ml:aan puskuroitua vettä niin, että Giemsan reagenssi kaadetaan varovasti puskuroituun veteen.

## Parierojen t-testit

**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	neutrof_A	59,006	90	9,3173	,9821
	neutrof_B	58,683	90	8,8608	,9340
Pair 2	lymfos_A	33,567	90	8,8588	,9338
	lymfos_B	34,189	90	8,7428	,9216
Pair 3	monos_A	5,067	90	2,0488	,2160
	monos_B	4,811	90	2,0847	,2197

**Paired Samples Correlations**

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	neutrof_A & neutrof_B	90	,905	,000
Pair 2	lymfos_A & lymfos_B	90	,901	,000
Pair 3	monos_A & monos_B	90	,656	,000

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. De- viation	Std. Error Mean	95% Confidence Inter- val of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 neutrof_A - neutrof_B	,3222	3,9826	,4198	-,5119	1,1564	,768	89	,445
Pair 2 lymfos_A - lymfos_B	-,6222	3,9186	,4131	-1,4430	,1985	-1,506	89	,136
Pair 3 monos_A - monos_B	,2556	1,7145	,1807	-,1035	,6147	1,414	89	,161